

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/020552 A1(51) 国際特許分類: C09K 15/06, A61K 47/26, 47/36,  
7/00, C08F 2/40, A23L 1/03, 3/3562, C11B 5/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010794

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-256069 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株  
式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA  
HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO)  
[JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番  
3 号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 奥 和之

(OKU, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下  
石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内  
Okayama (JP). 久保田 倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP];  
〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株  
式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 福田 恵  
温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県  
岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学  
研究所内 Okayama (JP). 三宅 俊雄 (MIYAKE, Toshio)  
[JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番  
3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).添付公開書類:  
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: RADICAL REACTION INHIBITORS, METHOD FOR INHIBITION OF RADICAL REACTIONS, AND USE  
THEREOF

(54) 発明の名称: ラジカル反応抑制剤及びラジカル反応抑制方法並びにその用途

(57) Abstract: The problem of the invention is to provide radical reaction inhibitors for inhibiting unsaturated compounds from  
decomposing through radical reactions, a method for inhibiting the formation of free radicals from unsaturated compounds and rad-  
ical reactions of the compounds, and compositions which are suppressed in radical formation, radical reactions, or progress of both.  
The above problem is solved by establishing radical reaction inhibitors containing as the active ingredient cyclic tetrasaccharides or  
mixtures of cyclic tetrasaccharides with saccharide derivatives thereof, a method for inhibiting the formation of free radicals from  
unsaturated compounds and radical reactions of the compounds, and compositions which contain the inhibitors and which are sup-  
pressed in radical formation, radical reactions, or progress of both.(57) 要約: 本発明は、不飽和化合物がラジカル反応を起こして分解が進むのを防止するラジカル反応抑制剤、不飽  
和化合物からのラジカル生成及びそのラジカル反応を抑制する方法、及びラジカル生成、ラジカル反応、又は  
それらの進行が抑制された組成物を提供することを課題とし、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘  
導体との混合物を有効成分として含有するラジカル反応抑制剤、当該抑制剤を用いて不飽和化合物からのラジカル  
の生成及びそのラジカル反応を抑制する方法、当該抑制剤を含有するラジカル生成、ラジカル反応、又はそれら  
の進行が抑制された組成物を確立することにより前記課題を解決するものである。

WO 2004/020552 A1

## 明 細 書

## ラジカル反応抑制剤及びラジカル反応抑制方法並びにその用途

## 5 技術分野

本発明は、新規なラジカル反応抑制剤及びその用途、より詳細には、グルコースが4個、 $\alpha-1, 3$ と $\alpha-1, 6$ 結合で環状に結合した非還元性の糖質、即ち、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow$ )で示される環状四糖(以下、単に「環状四糖」という。)、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を有効成分とする新規なラジカル反応抑制剤、該ラジカル反応抑制剤とともに不飽和化合物を含む組成物、及び、該抑制剤を不飽和化合物を含む組成物に含有させることを特徴とするラジカル反応の抑制方法に関するものである。

## 背景技術

脂質、染料、合成高分子をはじめとする有機化合物を主体とする製品が、その保存中に異臭の発生、変色・退色、硬化、分解、変性などにより品質劣化や機能低下を起こすことはよく知られている。また、飲食品や医薬品などの場合には、ラジカル反応により生じる過酸化物が、タンパク質、ペプチド及び／又はアミノ酸などの不飽和化合物以外の成分を変性させ、該製品の品質や機能の一層の低下をもたらすことが知られている。しかも、近年、ラジカル反応により生じる過酸化物は、細胞、組織に対する傷害作

用があることから生活習慣病をはじめとする各種疾患との関連も注目されている。

このような品質劣化や機能の低下、ひいてはヒトの健康に害を及ぼすとさえいわれる成分の生成をもたらす主要な反応は、有機化合物が無触媒下に起こす化学反応である。つまり、ラジカル化し易い有機化合物ほど上記のような品質劣化、すなわち化学的変化を起こし易いといえる。そして、ラジカル化のし易さは、分子内に不飽和結合が存在するか否か、ならびに、その存在様式と密接に関連しているといわれている。更に、有機化合物のラジカルが何らかの原因で一旦生成すると、該ラジカルとその近傍に存在する他の未反応の分子や分子状酸素との間で多様な反応が連鎖的に進行し、より大きな品質劣化や機能低下を引き起こすこととなる。有機化合物のラジカル化は、光照射や加温など日常的に起こり得る環境条件下で容易に誘発されるため、ラジカルにより連鎖的に進行する反応（以下、「ラジカル反応」という。）による製品の化学的変化は、食品分野、化粧品分野、医薬品分野、化学工業品分野などの広範な分野で起こり得る問題である。このため、ラジカル反応を阻止、抑制することは、特定の分野に限らず、製品の品質や機能を保持する上で極めて重要な課題のひとつである。

この課題を解決するための手段として、現在のところ、各分野において最も汎用されている手段は、一般にラジカルスカベンジャーと呼ばれる物質、すなわち、既に存在しているラジカルと反応し、それ自体が化学的に変化することによりラジカルの反応性を阻止ないしは抑制する物質を製品又はその原料に添加することである。しかしながら、ラジカルスカベンジャーによるラジカル反応の抑制効果は際限なく持続するものではないという欠点があ

る。

このような状況をふまえて、例えば、特開 2 0 0 1 - 1 2 3 1  
9 4 号公報（以下、「特許文献 1」と言う。）には、 $\alpha$ ， $\alpha$ -トレ  
ハロース及び／又はマルチトールを含有せしめることにより、脂  
5 肪酸類からの揮発性アルデヒドの産生を抑制する方法が提案され  
ている。しかしながら、現在の多様な食生活に対応するためには、  
継続的に摂取しても、食品の味、香り、食感などの風味の低下を  
もたらすことがなく、しかも、安全なラジカル反応の抑制効果を  
有する機能性に優れた食品素材のさらなる開発が望まれている。

10 一方、本発明者らは、国際公開 W O 0 1 / 9 0 3 3 8 号明細  
書（以下、「特許文献 2」と言う。）、或いは、国際公開 W O 0 2  
/ 1 0 3 6 1 号明細書（以下、「特許文献 3」と言う。）において、  
環状四糖が、脂質の劣化抑制やタンパク質の変性抑制効果を有す  
ることを開示したものの、その実体については依然として不明で  
15 あり、また、これら特許文献 1～3 には、環状四糖、又は、この  
環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物が、不飽和化合物の  
ラジカル化、或いは、それに続く一連のラジカル反応の進行を抑  
制することについてはなんら記載されていない。

## 20 発明の開示

本発明は、不飽和化合物がラジカル反応を起こして分解が進行  
し、それを含む組成物の保存中に異臭の発生、褐変、退色、硬化、  
分解、変性などが発生することに加え、ラジカル反応により生成  
する過酸化物が、さらに、共存するタンパク質、ペプチド、アミ  
25 ノ酸などの不飽和化合物以外の成分を修飾することに起因する製  
品の品質や機能の一層の低下を改善するために、ラジカルの生成

及びラジカル反応の進行（ラジカル反応により生成した過酸化物が、さらに、共存するタンパク質、ペプチド類、アミノ酸類などの不飽和化合物以外の成分を修飾、変性させる反応も含む）を抑制、阻止するためのラジカル反応抑制剤を提供することを第一の課題とし、該ラジカル反応抑制剤を用いた不飽和化合物のラジカルの生成及びラジカル反応を抑制する方法を提供することを第二の課題として、該ラジカル反応抑制剤を含有するラジカル反応が抑制された組成物を提供することを第三の課題とするものである。

本発明者らは、上記の課題を解決する目的で、糖質を用いるラジカルの生成及びラジカル反応の抑制並びにタンパク質の変性抑制の方法について長年に渡り研究を進めてきた。その結果、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物が、不飽和化合物のラジカルの生成及びラジカル反応の進行の抑制に強く働くこと、さらには、該ラジカル反応により生じた過酸化物が、タンパク質をはじめとする不飽和物質以外の成分を修飾乃至変性させることを抑制することを新たに見いだし、ラジカル反応抑制剤を確立するとともに、それを用いたラジカルの生成抑制方法及びラジカル反応の抑制方法を確立し、更に、ラジカル反応抑制剤を含有する組成物を確立することにより、本発明を完成するに至った。即ち、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物がラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制できることを明らかにし、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を有効成分として含有するラジカル反応抑制剤を確立し、ラジカルの生成及びラジカル反応が発生する前、または、発生している有機の不飽和化合物を含む反応系に上記のラジカル反応抑制剤を含有させることで、ラジカルの

生成及びラジカル反応の進行を抑制する方法を確立し、更に、不飽和化合物を含有する食品、化粧品、医薬品、化学工業品などにラジカル反応抑制剤を含有させた組成物を確立することにより、本発明を完成するに至った。

5

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用される環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、その由来や製法は問わず、発酵法、酵素法、有機合成法などにより製造されたものでもよく、それら  
10 の方法により得られる反応液は、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含む溶液として、そのまま、部分精製して、或いは、高純度に精製して使用することも自由である。環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、例えば、本発明者らが、特許文献 2 に開示した、パ  
15 ノースを  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素によって環状四糖に変換する方法、或いは、特許文献 3 に開示した、澱粉から直接  $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせる環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を製造する方法などの、澱粉質或いはそれ由来  
20 の糖質を原料とした酵素法により製造することができる。これらの製造方法は、豊富で安価な澱粉質を原料とし、高効率かつ安価に環状四糖やその誘導体を製造できることから、工業的に有利に実施できる。また、環状四糖には、無水非晶質、無水結晶、1 含水結晶、5 含水結晶が存在し、その何れを使用することも可能で  
25 ある。さらに、環状四糖のうち無水結晶、1 含水結晶及び無水非晶質のものは、優れた脱水能を有していることから、不飽和化

物を含有する含水物を粉末、固化する場合には、該含水物に添加することにより脱水剤としても作用し、環状四糖を有効成分として含有する高品質の粉末、固型製品の製造に有利に使用できる。

また、本発明でいう環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物とは、環状四糖とともに環状四糖に1種又は2種以上のグリコシル基が1個又は2個以上結合した環状四糖の糖質誘導体との混合物、或いは、該環状四糖と環状四糖の糖質誘導体とともにそれら糖質以外の糖質を含有するものをいう。環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、例えば、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を組み合わせさせて澱粉に作用させて得られる糖液のように、環状四糖と環状四糖分子の1個又は2個以上のOH基に、1個又は2個以上のグルコースが結合した糖質誘導体及び／又は該糖質誘導体とグルコース、マルトオリゴ糖、マルトデキストリンなどの糖質混合物、或いは、それらを、イオン交換樹脂などで部分精製したものや高純度に精製したものであってもよい。また、糖質組成物中に環状四糖を含んでいるものであれば、例えば、本発明者等が国際公開WO 02/072594号明細において開示した方法などにより、環状四糖と環状四糖に1個又は2個以上のグルコースの結合した環状四糖の糖質誘導体との混合物に、さらに、例えば、サイクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、リゾチームなどの糖転移能を有する酵素の1種又は2種以上を、該酵素の基質となる単糖、オリゴ糖及び／又は多糖の存在下で作用させて、環状四糖と環状四糖に1個又は2個以上のグルコースの結合した糖質誘導体の1個又は2個以上の任意のOH基に、さらに、1個又は2個以上の $\alpha$ -D-

グルコピラノシル基、 $\beta$ -D-ガラクトピラノシル基、 $\beta$ -D-キトサミニル基などのグリコシル基の1種又は2種以上を転移させて得られる糖質誘導体、或いは、それを部分精製したもののや高純度に精製したものであってもよい。

- 5 本発明でいう不飽和化合物とは、炭素鎖に、炭素-炭素間の不飽和結合（以下、単に「不飽和結合」という。）すなわち、二重結合又は三重結合を有する炭化水素、ならびに斯かる炭化水素における水素原子を他の元素や基などで置換した誘導体を意味し、脂肪酸類、アルコール類、単純脂質類、複合脂質類、テルペン類、  
10 合成高分子類、ビニル類などに属する化合物を挙げることができる。

- 本発明でいう脂肪酸類とは、カルボキシル基を1又は2個有し、分岐構造、環状構造及び／又はヒドロキシル基を有することもある鎖式化合物ならびにその塩を意味する。具体例としては、オレ  
15 イン酸、パルミトレイン酸、ネルボン酸、ツズ酸、トウハク酸、バクセン酸などのモノエン型脂肪酸（二重結合を1個有する）、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどのポリエン型脂肪酸（二重  
20 結合を2個以上有する）、リリン酸、キシメニン酸、エリトロゲン酸、クレペニン酸、マイコマイシンなどのアセチレン型脂肪酸（三重結合を1個以上有する）、ムコン酸などのポリエンジカルボン酸型脂肪酸（2個以上の二重結合と2個のカルボキシル基を有する）  
などが挙げられる。

- 25 アルコール類とは、鎖式炭化水素の水素原子を水酸基で置換した化合物を意味し、水酸基を1個有する1価アルコールと、水酸



基を2個以上有する多価アルコールとを含む。具体例としては、オレイルアルコールが挙げられる。

単純脂質類とは、構成原子が炭素原子、水素原子及び酸素原子からなり、分子中に脂肪酸類化合物に相当する炭化水素鎖を有する有機化合物を意味し、代表的なものとしては、脂肪酸類化合物とアルコール類化合物との脱水縮合物（エステル）ならびにその相当物が挙げられる。具体的としては、アルコール部分が1価アルコールであるオレイン酸デシル及びオレイン酸オクチルドデシル、アルコール部分がプロピレングリコールであるジオレイン酸プロピレングリコール、アルコール部分がグリセロールであり、脂肪酸部分が上記に例示したような不飽和脂肪酸であって、1分子中に1個、2個又は3個の脂肪酸部分を含むモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールならびにトリアシルグリセロール（以上3種をまとめて「中性脂肪」という場合がある）、アルコール部分がグリセリン重合体であり、脂肪酸部分が上記に例示したような不飽和脂肪酸であるポリグリセリン脂肪酸エステル、アルコール部分がショ糖である（ショ糖脂肪酸エステル）、ショ糖モノオレアート、ショ糖モノリノラート及びショ糖ジオレアートなどが挙げられる。なお、通常「油脂」と呼ばれるものはトリアシルグリセロールを主体とする油溶性物質を含む組成物であり、また、油脂はさらに、常温で液体の「脂肪油」と常温で個体の「脂肪」とに分類されており、これらは通常不飽和化合物を含んでいるので、当然ながら本発明の対象となり得る。

複合脂質類とは、上記で定義した単純脂質類と同じく分子中に脂肪酸類化合物に相当する炭化水素鎖を有する一方、構成原子として炭素原子、水素原子及び酸素原子に加えて、リン原子や窒素

原子などを含む有機化合物を意味する。複合糖脂質類は一般に、グリセロリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴリン脂質、スフィンゴ糖脂質の4種に大別され、さらに本発明においてはこれらの誘導体や部分分解物、例えば、セラミドなども複合脂質類に含まれるものである。具体例としては、グリセロリン脂質としては、レシチン（ホスファチジルコリン）、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリノシトールなどが、グリセロ糖脂質としては、分子内に1個又は2個以上のグルコシル基やガラクトシル基などの糖残基を有するジアシルグリセロールなどが、スフィン

5      ゴリン脂質としては、スフィンゴミエリンなどが、スフィンゴ糖脂質としては、セレブロシド、セラミドなどがそれぞれ挙げられる。

テルペン類とは、化学式  $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3)\text{CH} = \text{CH}_2$  で表されるイソプレンを構成単位とする有機化合物を意味し、鎖状構造を有するものと環状構造を有するものがある。また、本発明においては、イソプレン構造を部分的に含む複合テルペンもテルペン類に含まれるものとする。具体例としては、モノテルペン、ジ

15      テルペン、トリテルペン、スクアレン、テトラテルペン、カロテノイドなどのほか、 $\alpha$ -カロテン、 $\beta$ -カロテン、アスタキサンチン、カンタキサンチン、アブシジン酸、ビタミンA、ビタミンEなどの複合テルペンが挙げられる。

合成高分子類とは、有機化学的に合成された高分子物質を意味し、合成ゴム、熱硬化性樹脂、熱可塑性樹脂に大別される。合成ゴムの多くは不飽和結合を有しているので本発明の有効な対象であり、具体例としては、イソプレングム、ブタジエングム、スチレン-ブタジエングム、ニトリルゴム、ニトリル-イソプレング

25      ゴム

ムなどが挙げられる。また、熱硬化性樹脂の例としては不飽和ポリエステル樹脂などが挙げられる。

ビニル類とは、化学式  $\text{CH}_2=\text{CH}-$  で表されるビニル基、化学式  $\text{CH}_2=\text{C}=\text{}$  で表されるビニリデン基若しくは化学式  $-\text{CH}=\text{CH}-$  で表されるビニレン基を有する有機化合物を意味する。

具体例としては、エチレン、プロピレン、ブチレン、イソブチレンなどのオレフィン炭化水素、ブタジエン、イソプレンなどのポリエン炭化水素、酢酸ビニル、ラウリン酸ビニルなどの酸ビニルエステル、アクリル酸メチル、アクリル酸エチルなどのアクリル酸エステル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチルなどのメタクリル酸エステル、ラウリルビニルエーテルなどのビニルエーテルのほか、塩化ビニル、塩化ビニリデン、スチレン、アクリロニトリル、アクリルアミド、マレイン酸、ビタミンD、ビタミンK、さらには、同じ特許出願人による特許第3232512号公報（特願平11-343211号）に開示されたスチリル色素、

同じ特許出願人による国際公開WO 01/040382号明細書（国際特許出願PCT/JP00/08298号）に開示されたインドレニン系ペンタメチンシアニン色素、同じ特許出願人による特開2002-212454号公報（特願2000-41001号）に開示されたトリメチンシアニン色素、同じ特許出願人による国際公開WO 01/062853号明細書（国際特許出願PCT/JP00/09257号）明細書に開示されたトリメチンシアニン色素、同じ特許出願人による国際公開WO 01/019923号明細書（国際特許出願PCT/JP00/06312号）に開示されたジメチン系スチリル色素、同じ特許出願人による特開2001-32179号公報（特願2000-203

8 7 3 号) に開示されたスチリル色素、同じ特許出願人による特  
開 2 0 0 1 - 3 2 3 1 7 9 号公報(特願 2 0 0 0 - 2 7 5 7 6 4 )  
に開示された非対称型インドレニン系ペンタメチンシアニン色素、  
同じ特許出願人による国際公開 W O 0 0 / 0 6 1 6 8 7 号明細  
5 書(国際特許出願 P C T / J P 0 0 / 0 2 3 4 9 号) に開示され  
た非対称型トリメチン系シアニン色素、化粧品原料基準(日本公  
定書協会編、『化粧品原料基準 第二版注解 Ⅰ』、1 9 8 4 年、  
薬事日報社発行) に収載されている感光素 1 0 1 号(別名プラト  
10 ニン)、感光素 2 0 1 号(別名ピオニン)、感光素 3 0 1 号(別名  
タカナール)、感光素 4 0 1 号(別名ルミネキス)などが挙げられ  
る。

本発明でいうラジカル化は特定の原因に限定されるものではない。  
例えば、不飽和化合物は一般に、無触媒下で光照射や加温など  
により、また、金属触媒などの適宜の触媒の作用により、さら  
15 に、活性酸素などの他のラジカル作用によりラジカル化するこ  
とが知られている。

本発明のラジカル反応抑制剤は、不飽和化合物又は不飽和化合  
物を含む組成物を原材料、添加物、製品などとして扱う分野であ  
って、且つ、不飽和化合物の化学的変化の回避が求められる諸種  
20 の分野、例えば、飲食品分野、農林水産分野、化粧品分野、医薬  
品分野、日用品分野、化学工業分野、染料分野、塗料分野、建材  
分野、香料分野、化学薬品分野、合成繊維分野、色素分野、感光  
色素分野、光記録媒体分野ならびに、これらの分野で利用される  
原材料、又は添加物の製造分野などの極めて広範な分野において  
25 有用である。

飲食品分野にあつては、不飽和化合物である脂質とともにタン

パク質を含有する組成物が大部分を占めることから、脂質のラジカル化、該ラジカル反応の進行を抑制するとともに、ラジカル反応によって生じる脂質過酸化物がタンパク質を修飾、変性させる過程を抑制することのできる本発明のラジカル反応抑制剤は、タンパク変性抑制剤として飲食品の風味（品質）保持に極めて有利に利用できる。しかも、本発明のラジカル反応抑制剤は、過酸化物を含有する飲食品を摂取した場合であっても、過酸化物によって組織や組織に存在する酵素が修飾、変性することが効果的に抑制されることに加え、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物が、食物繊維作用や体脂肪の蓄積を抑制する作用なども有していることから、健康食品用の原料としても有利に利用できる。

さらに、本発明のラジカル反応抑制剤は、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康食品、医薬品などの安定化剤として有利に適応できる。例えば、インターフェロナー $\alpha$ 、インターフェロナー $\beta$ 、インターフェロナー $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーフアクター、インターロイキン類などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エритроポエチン、卵細胞刺激ホルモン、胎盤ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、フィコシアニン、フィコエリトリンをはじめとする色素タンパク質、リパーゼ、エラスターゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グル

カナーゼ、ラクターゼ、補体系などの酵素や血液成分などのペプチド或いはタンパク質の変性を抑制し、それらの生理活性を安定に保持することができるので、高品質の健康食品、医薬品或いは試薬などの製造にも有利に利用できる。

- 5       また、特に、組織や細胞レベルのラジカルの発生及びそれに引き続く一連のラジカル反応を抑制することから、生体内で発生するラジカルの生成を伴う炎症反応の抑制剤として、アトピーをはじめとする皮膚炎、湿疹、蕁麻疹、虫刺され、火傷、日焼け、免疫反応を介する各種の炎症性疾患、口内炎、歯肉炎、結膜炎、胃炎、大腸炎、潰瘍性大腸炎、クローン病などの臓器の炎症性疾患  
10       などの予防、治療にも有利に利用できる。

本発明のラジカル反応抑制剤は、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を、環状四糖の無水物としての換算で約 1 w / w % (以下、本明細書では特に断らない限り、  
15       w / w % を単に % と表記する。) 以上、望ましくは、10 % 以上、さらに望ましくは 30 % 以上含有するものが好適である。本発明のラジカル反応抑制剤は、不飽和化合物のラジカルの生成及びラジカル反応の進行の抑制効果を発揮出来ればよく、有効成分である環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混  
20       合物のみで構成されていてもよいし、該糖質とともに、環状四糖の製造工程において共存するグルコース、イソマルトース、マルトース、マルトトリオース、マルトデキストリンなど、環状四糖及び環状四糖の糖質誘導体以外の糖質を含有していてもよい。逆に、本発明のラジカル反応抑制剤を使用する組成物が、アミノ酸  
25       などのように分子内にアミノ基を有する物質を含む場合には、グルコースをはじめとする還元性糖類が混在するとメーラード反応

などにより該組成物中の有効成分及び／又は該組成物自体の品質低下が特に問題となることが予想される場合には、本発明のラジカル反応剤として、環状四糖を、98%以上、望ましく99%以上、さらに望ましくは99.5%以上含有するものが好適であり、  
5 或いは、環状四糖、又は、環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物と共存する還元性の糖質に水素添加して、その還元性を低減したものを使用することも可能である。また、環状四糖は安定な糖質なので、本発明のラジカル反応抑制剤を使用する組成物の品質を低下させない限り、必要に応じて、ラジカルスカベンジャーの他、分散性を高めたり、増量などの目的に応じて、還元性糖  
10 質類、非還元性糖質類、糖アルコール類、水溶性多糖類、無機塩類、乳化剤、酸化防止剤及びキレート作用を有する物質から選ばれる1種又は2種以上と併用することも随意である。さらに必要であれば、公知の着色料、着香料、保存料、安定剤などを適量併  
15 用することも随意である。このようにして得られたラジカル反応抑制剤は、その形状を問わず、例えば、シラップ、マスキット、ペースト、粉末、結晶、顆粒、錠剤などの何れの形状であってもよい。

また、本発明のラジカル反応抑制剤と併用される非還元性糖類  
20 としては、トレハロース( $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、 $\alpha$ ,  $\beta$ -トレハロース或いは $\beta$ ,  $\beta$ -トレハロースの1種又は2種以上の組み合わせ)が、又、糖アルコール類としてはマルチトールが、何れも、優れた脂質の変敗抑制効果や脂質からのアルデヒド類の生成を抑制する効果を有する点から望ましく、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース  
25 は、それらの効果が極めて高いことから、特に望ましい。

本発明のラジカル反応抑制剤は、その各々の使用分野において

通常使用される酸化防止方法と組み合わせて用いることにより、単独の使用よりも更に効率的にラジカル反応を抑制することができる。酸化防止方法としては、例えば、抗酸化剤、脱酸素剤、ラジカルスカベンジャー、金属のキレート剤などとの併用や、本発明のラジカル反応抑制剤を含有する組成物を、カプセルへ封入したり、コーティング処理、密封容器での保存、不活性ガスの封入などにより酸素との接触の遮断、さらには、遮光、低温保存などからえられる１種又は２種以上を適宜組み合わせて使用することができる。

- 10 本発明でいうラジカルスカベンジャーとは、反応中に生じるラジカルを効率的に捉えるために使用される化合物であれば、何れでもよく、ラジカル反応抑制剤の用途に応じて１種又２種以上が、適宜選択される。例えば、アスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体、ビタミンB<sub>2</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>誘導体、ヘスペリジン、ルチン或
- 15 いはその誘導体などのビタミン類、ポリフェノール類などのフラボノイド類、ジブチルヒドロキシトルエン、没食子酸プロピル、ジフェニルピクリルヒドラジル、ガルビノキシル、ハイドロキノ
- ン、ハイドロキノン誘導体などを挙げることができ、また、前記不飽和化合物の中からも、例えば、ビタミンA、ビタミンEやそ
- 20 れらの誘導体などに代表されるテルペン類、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などに代表される不飽和脂肪酸のような不飽和化合物を、その用途に応じて適宜使用することも自由である。

- 本発明でいう、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有させる、或いは、それらを有効成分とするラジカル反応抑制剤を含有させるとは、当該成分とそれ以外
- 25 の成分が直接接触できるように、その利用目的に応じて、原料の



段階から製品の段階に至るまでの適宜の工程、或いは、既存の製品に対して、例えば、混和、混捏、溶解、融解、分散、懸濁、乳  
化、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶出、固化な  
5 どの方法で接触させることを意味する。また、本発明で使用する  
環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合  
物の形態に特に制限はなく、例えば、シラップ、マスキット、固  
状物及び粉末の1種又は2種以上を適宜選択して使用することが  
できる。

環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混  
10 合物を含有させる量は、不飽和化合物のラジカル生成抑制及び  
／又はラジカル反応の進行の抑制効果を発揮できる量であればよ  
く、特に制限はないが、通常、不飽和化合物に対して、環状四糖  
の無水物としての換算で約0.01%以上約99.9%未満、さら  
に好ましくは、約1.0%以上約90%未満をできるだけ均一  
15 に含有せしめるのが好適である。通常0.01%未満では、不飽  
和化合物のラジカル生成及びラジカル反応の進行を効果的に抑  
制するには不十分である。

以下、実験例に基づいて環状四糖、又は、この環状四糖と環状  
四糖の糖質誘導体との混合物による、不飽和化合物のラジカル  
20 生成抑制及び／又はラジカル反応の進行の抑制についてより詳細  
に説明する。

#### 実験1-1 環状四糖及び環状四糖の糖質誘導体の調製

特許文献3に開示された実施例2の方法に準じて、固形分あた  
25 り環状四糖61.7%、環状四糖の糖質誘導体5.1%を含有す  
るシラップを調製した。同様に、特許文献3に開示された実施例

3の方法に準じて、タピオカ澱粉を原料として調製した環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するシラップを、特許文献3の実施例5に記載の方法に準じて精製、濃縮、乾燥・結晶化して、純度98.5%の環状四糖5含水結晶を得た。さらに、  
5 前記環状四糖5含水結晶をさらに、特許文献3に開示された実験31或いは実験32の方法に準じて乾燥し、環状四糖1含水結晶粉末及び環状四糖無水結晶粉末を調製した。

#### 実験1-2 ラジカル生成抑制に及ぼす環状四糖の影響

10 ラジカル生成抑制に及ぼす環状四糖の影響を調べるための実験は次のようにして行った。1mM過酸化水素( $H_2O_2$ )溶液50 $\mu$ lに順次、89mM5,5-ジメチル-1-ピロリノーオキシド(DMPO、和光純薬株式会社販売)溶液50 $\mu$ l、実験1-1で調製した環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有  
15 するシラップ、環状四糖5含水結晶、環状四糖1含水結晶或いは、環状四糖無水結晶を、各々環状四糖としての換算で15mM、38mM、75mM、150mMとなるように調製した水溶液50 $\mu$ l又は蒸留水50 $\mu$ l、各1mMの硫酸鉄、ジエチレントリアミン-N,N,N',N'',N''-5酢酸(DTPA、和光純薬株式会社販売)溶液50 $\mu$ lを添加混合して反応を開始させ、電子ス  
20 ピン共鳴スペクトル(ESR)測定用セルに入れて、測定装置にセットして、反応開始一定時間後のヒドロキシラジカルの生成量を測定した。なお、陽性対照として、環状四糖に代えて、ラジカル生成抑制効果のあることが知られている $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース  
25 ((株)林原商事販売、商品名『トレハ』)を使用して、同様の測定を行った。ESRの測定には(株)日本電子製装置「Free R

adical Monitor JES-FR30」を用い、ヒドロキシラジカルの生成量は、スピントラップ剤として使用した 5, 5-ジメチル-1-ピロリン-オキシド-OH (ヒドロキシラジカル) に特有の 4 つのシグナルピークの内、測定開始後最初に観  
 5 察されるピークと、JES-FR30 装置に装着されている外部標準の  $Mn^{2+}$  のピークの高さとの比を求めて、相対値として表 1 に示す。なお、環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するシラップ、環状四糖 5 含水結晶、環状四糖 1 含水結晶或いは、環状四糖無水結晶は何れも同様の 5, 5-ジメチル-1-ピ  
 10 ロリン-オキシド-OH (ヒドロキシラジカル) に特有の 4 つのシグナルピークを示したので、環状四糖 5 含水結晶を使用した場合の結果のみを示す。

表 1

	ヒドロキシラジカル生成量 (生成率 (%))				
糖質の濃度 (mM)	0	15	38	75	150
環状四糖	2.995 (100)	1.009 (34)	0.265 (9)	0.228 (8)	0.125 (4)
$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	2.995 (100)	1.974 (66)	0.692 (23)	0.236 (8)	0.194 (6)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{各糖質濃度のヒドロキシラジカル生成量}}{\text{糖質無添加のヒドロキシラジカル生成量}} \times 100$$

## 15 結果

ヒドロキシラジカルの生成は環状四糖の添加量の増加とともに減少し、糖質無添加の場合と比較して、75 mM 濃度の時で約 8 %

の生成率となり、150 mM 濃度では約4%の生成率となった。  
 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの場合も、同じ濃度でのヒドロキシラジカルの生成率は、ほぼ同じ値を示した。しかし、38 mM 以下の低い濃度範囲で、その生成率は、糖質無添加の場合と比較して、環  
5 状四糖を添加した場合には、15 mM 濃度で約34%、38 mM 濃度で約9%となっており、ヒドロキシラジカルの生成が強く抑制されたのに対して、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを添加した場合には、5 mM 濃度で約66%、38 mM 濃度で23%となり、環状四糖を添加した場合に比して2倍以上のヒドロキシラジカルの生成率とな  
10 った。この結果より、環状四糖のヒドロキシラジカル生成抑制効果は $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースよりも明らかに大きいことが判明した。

### 実験1-3 低比重リポタンパク質 (LDL) 酸化抑制に及ぼす 15 環状四糖の影響

低比重リポタンパク質 (LDL) 酸化抑制に及ぼす環状四糖の影響を調べるための実験は次のようにして行った。すなわち、0.5 mg / ml 低比重リポタンパク質 (LDL) - リン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.4) 2.5 ml と、実験1-1で調製した  
20 環状四糖5含水結晶、環状四糖1含水結晶、環状四糖無水結晶の何れかの100 mM PBS 溶液2.5 ml、或いは、環状四糖無添加のPBS 溶液2.5 ml とを混合後、100 mM 2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) - PBS (pH 7.4) 溶液50  $\mu$ l を添加、混合し、37  $^{\circ}$ C で反応を行  
25 った。反応は、経時変化を求めるために、240分間継続した。各反応液は、反応開始0、30、60、120、180、240

分のものについて、LDL酸化物の増加に比例して増大する吸光度（234nm）を測定した。実験により得られたLDL酸化物の量（234nm吸光度）の経時変化を表2に示す。なお、環状四糖5含水結晶、環状四糖1含水結晶或いは、環状四糖無水結晶はどれも同様の酸化抑制パターンを示したので、環状四糖5含水結晶を使用した場合の結果のみを示す。また、0.5mg/ml低比重リポタンパク質（LDL）のPBS溶液2.5mlと、実験1-1で調製した環状四糖5含水結晶を2mM、10mM或いは20mMとなるように溶解したPBS溶液2.5ml、或いは、

10 環状四糖無添加のPBS溶液2.5mlとを混合後、同様に234nmの吸光度を測定して、低比重リポタンパク質（LDL）のAApH酸化に対する環状四糖の影響を調べた。環状四糖の添加量と反応120分後のLDLの酸化量（234nm吸光度）の関係を表3に示す。

15 表 2

AApH添加後の時間（分）	吸光度（234nm）		生成率（%）
	環状四糖無添加	環状四糖添加（50mM）	
0	0.0	0.0	-
30	0.127	0.018	14
60	0.211	0.042	20
120	0.215	0.046	21
180	0.245	0.056	23
240	0.279	0.064	23

$$\text{生成率（\%）} = \frac{\text{各時間の環状四糖添加時の吸光度}}{\text{各時間の環状四糖無添加時の吸光度}} \times 100$$

表 3

環状四糖の濃度 (mM)	吸光度 (234 nm)	生成率 (%)
	平均	
0	0.215	100
1	0.163	76
5	0.076	35
10	0.028	13

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{環状四糖の各濃度の吸光度}}{\text{環状四糖無添加の時の吸光度}} \times 100$$

表 2 に示すように、環状四糖無添加 (0 mM) の系および環状四糖添加 (50 mM) の系ともに、反応開始後 60 分間は LDL の酸化物が経時的に増加し、その後はほぼ平衡に達することが明らかとなった。240 分経過時での LDL 酸化物の生成は、糖質無添加の系と比較して、環状四糖を添加した場合には、約 23 % となり、強い抑制が認められた。また、表 3 から明らかなように、LDL 酸化物の生成は、環状四糖の添加量の増加とともに生成が減少し、糖質無添加の場合と比較して、10 mM の添加では約 13 % にまで抑制された。これらの結果より、環状四糖は LDL の酸化を効果的に抑制することが判明した。

実験 1-4 リノール酸のラジカル酸化に及ぼす環状四糖の影響

リノール酸のラジカル酸化に及ぼす環状四糖の影響を調べるための実験は、次のようにして行った。

#### リノール酸酸化に及ぼす環状四糖の影響の測定

11. 7 mg / ml リノール酸 - エタノール溶液 1 ml、50

m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2 ) 1 m l 、 1 0 0 m M 2 , 2 , -  
アソビス ( 2 - アミジノプロパン ) 2 塩酸塩 ( A A P H ) 溶液 1  
m l 、 実験 1 - 1 で調製した環状四糖 5 含水結晶の 2 0 0 m M P  
B S ( 5 0 m M 、 p H 7 . 2 ) 溶液 2 m l を混合し、 3 7 ° C で静  
5 置し、混合後、 0 、 1 、 2 、 6 時間で試験標品をサンプリングし、  
該試験標品中に生成した共役ジエン量及びチオバルピツール酸と  
の反応生成物 ( T B A R S ) 量を測定した。陰性対照として、環  
状四糖無添加の P B S を使用して同様の測定を行った。共役ジエ  
ン量は、岡村らの方法 (『ジャーナル オブ アグリカルチャ  
10 ラル アンド フード ケミストリー』 ( J o u r n a l o f  
A g r i c u l t u r a l a n d F o o d C h e m i s t  
r y ) 、第 4 2 巻、 1 6 1 2 頁、 ( 1 9 9 4 年 ) ) に従って、 2 3 4  
n m の吸光度を測定することにより求めた。 T B A R S 量は、大  
河原らの方法 (『ジャーナル オブ リピッド リサーチ』 ( J o  
15 u r n a l o f L i p i d R e s e a r c h ) 、第 1 9 巻、  
1 0 5 3 頁 ( 1 9 7 8 年 ) ) に従って、サンプリングした各試験標  
品をチオバルピツール酸と反応させた後、 5 3 2 n m の吸光度を  
測定することにより求めた。なお、 T B A R S 生成量は、 1 , 1 ,  
3 , 3 - テトラエトキシプロパンをエタノールで、 1 0 、 5 0 、  
20 1 0 0  $\mu$  g / m l に希釈した溶液を、試験標品と同様にチオバル  
ピツール酸と反応させて、その吸光度を測定し、生じる T B A R  
S 量 ( 計算値 ) と、測定した吸光度から作成した検量線を用いて、  
試験標品中の T B A R S 量を求めた。また、共役ジエン生成量は、  
前記『ジャーナル オブ アグリカルチャラル アンド フード  
25 ケミストリー』、第 4 2 巻、第 1 6 1 2 頁 ( 1 9 9 4 年 ) に記載さ  
れた、分子のモル吸光計数に基づき、以下の実験により得られた

吸光度から計算により求めた。生成する共役ジエン生成量の測定結果を表4に、TBARS生成量の測定結果を表5に示す。

表 4

	共役ジエン生成量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ - リノール酸) (生成率: %)			
反応時間 (時)	0	1	2	6
環状四糖無添加	0.27 (100)	9.43 (100)	17.98 (100)	59.21 (100)
環状四糖添加	0.27 (100)	5.16 (55)	9.15 (51)	23.83 (40)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{各時間の環状四糖添加時の共役ジエン生成量}}{\text{各時間の環状四糖無添加時の共役ジエン生成量}} \times 100$$

5

表 5

	TBARS生成量 ( $\mu\text{g}/\text{g}$ - リノール酸) (生成率: %)			
反応時間 (時)	0	1	2	6
環状四糖無添加	0.00 (-)	2.76 (100)	10.26 (100)	26.43 (100)
環状四糖添加	0.00 (-)	1.52 (55)	3.55 (35)	7.97 (30)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{各時間の環状四糖添加時のTBARS生成量}}{\text{各時間の環状四糖無添加時のTBARS生成量}} \times 100$$



## 結果

表 4 から明らかなように、共役ジエンの生成は、反応開始後 6 時間で、環状四糖の添加では、糖質無添加の場合と比較して、約 40 % にまで抑制された。また、表 5 の結果から明らかなように、  
5 T B A R S の生成は、反応開始後 6 時間で、環状四糖の添加では、糖質無添加の場合と比較して、約 30 % にまで抑制された。これらの結果より、環状四糖は、リノール酸のラジカル酸化による共役ジエン生成ならびに T B A R S 生成を効果的に抑制することが判明した。

10

実験 1 - 5 脂質過酸化物によるタンパク質或いはリジン修飾抑制に及ぼす環状四糖及び他の糖質の影響

脂質のラジカル反応により生成する代表的な脂質過酸化物(2, 4 - デカジエナル及びマロンジアルデヒド(M D A))によるタンパク質或いはリジンの修飾、変性に及ぼす各種糖質の影響を、  
15 環状四糖、マルチトール、 $\alpha$ ,  $\alpha$  - トレハロース、ショ糖或いはそれらの混合物を使用して調べるための実験を、該脂質過酸化物がタンパク質或いはリジンと反応して生じるアルデヒド付加体(タンパクカルボニル及び酸化脂質/アミノ酸反応産物(O L A  
20 A R P s))の生成を指標にして、次のようにして行った。なお、実験は、溶液中の糖質の総モル濃度が一定となるよう各種糖質溶液を調製して行った。

## 試験用の各種糖質溶液の調製

25 5 m l の P B S (50 m M、p H 7.4) あたり、実験 1 - 1 で調製した環状四糖 5 含水結晶 500 m g、無水結晶マルチトール

ル ((株) 林原商事販売、商品名『マビット』) 250 mg、含水結晶  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース ((株) 林原商事販売、商品名『トレハ』) 250 mg 或いはショ糖 (試薬特級 和光純薬販売) 250 mg を溶解して、試験用糖質溶液とした。2種の糖質を組み合わせた  
5 試験には、5 ml の PBS あたり、環状四糖 250 mg 及びその他の糖質 125 mg を、3種類の糖質 (環状四糖、含水結晶  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、無水結晶マルチトール) を組み合わせた試験では、環状四糖 166.7 mg 及びその他の糖質を各々 83.3 mg を、それぞれ溶解して試験用糖質溶液を調製した。陰性対照  
10 として PBS を使用した。

#### 試験方法

調製した各試験用糖質溶液及び陰性対照 5 ml に対して、各々、牛血清アルブミン (BSA) 又は L-リジンを 10 mg 添加して  
15 溶解した後、脂質過酸化物として 2, 4-デカジエナル又はマロンジアルデヒド (MDA) 25  $\mu$ g を添加して、37  $^{\circ}$ C で 24 時間反応した。反応終了後、生成したアルデヒド付加体のタンパクカルボニル及び酸化脂質/アミノ酸反応産物 (OLAAPs) を比色法により定量した。BSA と脂質過酸化物の反応結果を表  
20 6 に、L-リジンと脂質過酸化物の反応結果を表 7 に示す。なお、タンパクカルボニル量及び OLAAPs 量は、バイオケム. バイオフィジ. アクタ (Biochim. Biophys. Acta)、第 1258 号、第 319~327 頁 (1985 年) に記載された、それぞれの分子のモル吸光計数に基づき、以下の実験により  
25 り得られた吸光度から計算により求めた。

### タンパクカルボニル量の測定方法

B S A を溶解した試験用糖質液或いは陰性対照と、脂質過酸化  
物との反応終了後、該溶液 2 m l に 1 2 . 5 m M ジニトロフェニ  
ルヒドラジン ( D N P H ) / 2 . 5 N 塩酸溶液 2 m l を加え、室  
5 温で 1 時間放置し、これに 3 0 % トリクロロ酢酸 ( T C A ) 2 m  
l を加え 0 ° C で 1 時間放置した。1 0 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間  
の遠心分離により沈殿物を得、これをエタノール / 酢酸エチル  
( 1 : 1 ) 2 m l で 4 回洗浄し、6 M グアニジン塩酸塩 / 2 0 m  
M N a P i / トリフルオル酢酸 ( T F A 、 p H 2 . 3 ) 2 m l を  
10 加え、3 7 ° C で 3 0 分間放置後、吸光度 ( 3 7 0 n m 、  $\epsilon = 2 2 ,$   
0 0 0 M<sup>-1</sup> c m<sup>-1</sup> ) を測定した。また、L-リジンを溶解した  
各試験用糖質液或いは陰性対照と、脂質過酸化物との反応終了  
後、該溶液 2 m l にジエチルエーテル 2 m l を加え未反応の脂質  
過酸化物を除去し、これに、1 2 . 5 m M D N P H / 2 . 5 N 塩  
15 酸溶液 2 m l を加え、室温で 1 時間放置後、吸光度 ( 3 7 0 n m 、  
 $\epsilon = 2 2 , 0 0 0 M^{-1} c m^{-1}$  ) を測定した。

### O L A A R P s の測定方法

B S A を溶解した試験用糖質液或いは陰性対照と脂質過酸化  
20 を反応後、該溶液 1 m l に、エーリッヒ試薬 ( ジメチルベンズア  
ルデヒド 2 0 0 m g 、エタノール 2 m l 、 3 . 5 N 塩酸 8 m l )  
1 5 0  $\mu$  l を加え、4 5 ° C で 3 0 分間放置した。これに 3 0 % ト  
リクロロ酢酸を 6 0 0  $\mu$  l 加え、0 ° C で 1 時間放置し、1 0 , 0  
0 0 r p m で 1 5 分間の遠心分離により沈殿物を得、これをエタ  
25 ノール / 酢酸エチル ( 1 : 1 ) 2 m l で 4 回洗浄し、6 M グアニ  
ジン塩酸塩 / 2 0 m M N a P i / T F A ( p H 2 . 3 ) 1 . 5 m

1を加え、37℃で30分間放置後、吸光度(580nm、 $\epsilon = 35,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )を測定した。また、L-リジンを溶解した試験用糖質液或いは陰性対照と脂質過酸化物の反応後、該溶液1mlにジエチルエーテル2mlを加え未反応の脂質過酸化  
5 物を除去し、エーリッヒ試薬150 $\mu$ lを加え、45℃で30分間放置した。これに、12.5mM DNPH / 2.5N塩酸溶液2mlを加え、45℃で30分間放置後、吸光度(580nm、 $\epsilon = 35,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )を測定した。

表 6

測定項目		アルデヒド付加体の生成量 ( $\mu\text{mol} / \text{g} - \text{BSA}$ )			
		タンパク質生成量 (生成率: %)		O L A A R P s 生成量 (生成率: %)	
添加した過酸化脂質		2,4-デヒドロキソニール M D A		2,4-デヒドロキソニール M D A	
添加した糖質	無添加	14.16 (100)	2.42 (100)	4.21 (100)	5.83 (100)
	環状四糖	6.34 (45)	1.09 (45)	2.92 (69)	4.68 (80)
	$\alpha, \alpha$ -トレハロース	8.26 (58)	1.45 (60)	2.67 (63)	3.24 (56)
	マルチトール	7.51 (53)	1.29 (53)	2.83 (67)	2.78 (48)
	ショ糖	14.47 (102)	2.23 (92)	4.77 (113)	7.75 (133)
	環状四糖 $\alpha, \alpha$ -トレハロース	7.13 (50)	1.17 (48)	2.48 (59)	3.86 (66)
	環状四糖 マルチトール	7.02 (50)	1.21 (50)	2.88 (68)	3.72 (64)
	環状四糖 ショ糖	9.25 (65)	1.57 (65)	3.15 (75)	5.22 (90)
	環状四糖 $\alpha, \alpha$ -トレハロース マルチトール	6.78 (48)	1.18 (49)	2.81 (67)	5.18 (89)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{糖質添加時のアルデヒド付加体生成量}}{\text{糖質無添加時のアルデヒド付加体生成量}} \times 100$$

表 7

測定項目		アルデヒド付加体の生成量 ( $\mu\text{mol} / \text{g-L-リジン}$ )			
		タンパクカルボニル生成量 (生成率 (%))		OLAARPs 生成量 (生成率 (%))	
添加した脂質過酸化物		2,4-デカジエナル MDA		2,4-デカジエナル MDA	
添加した糖質	無 添	13.46 (100)	6.00 (100)	8.12 (100)	8.64 (100)
	環状四糖添加	6.42 (48)	3.93 (66)	5.44 (67)	3.39 (39)
	$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	7.47 (55)	3.99 (67)	5.72 (70)	3.24 (38)
	マルチトール	6.81 (51)	3.29 (55)	5.90 (73)	7.23 (84)
	ショ糖	10.92 (81)	5.75 (96)	7.54 (93)	8.13 (94)
	環状四糖 $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	7.13 (53)	3.17 (53)	5.48 (67)	4.86 (56)
	環状四糖 マルチトール	7.02 (52)	3.21 (54)	5.88 (72)	4.72 (55)
	環状四糖 ショ糖	9.25 (69)	4.57 (76)	6.45 (79)	6.22 (72)
	環状四糖 $\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース マルチトール	6.78 (50)	3.18 (53)	5.81 (72)	5.83 (67)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{糖質添加時のアルデヒド付加体生成量}}{\text{糖質無添加時のアルデヒド付加体生成量}} \times 100$$

## 結果

表 6 から明らかなように、環状四糖は、脂質過酸化物の 2, 4-デカジエナル或いはマロンジアルデヒド (MDA) の添加による BSA からのタンパクカルボニル生成を、糖質無添加に比し

て、2, 4-デカジエナール或いはMDAの何れの場合にも約45%に抑制した。環状四糖に代えて $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース或いはマルチトールを添加した場合にも抑制が認められたものの、その程度は、環状四糖に比して低いものであった。また、2, 4-デ

5 カジエナール或いはMDAの添加によるBSAからのOLAAPsの生成は、環状四糖の添加では、糖質無添加の場合に比して、2, 4-デカジエナールでは約69%に、MDAでは約80%に抑制された。LAAAPsの生成は、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース或いはマルチトールの添加でも抑制が認められ、その程度は、2, 4-

10 -デカジエナールの添加では環状四糖とほぼ同程度であり、MDAの添加では、環状四糖よりも、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース或いはマルチトールを添加した場合の方が大きかった。一方、ショ糖は、前記アルデヒド付加体の生成を殆ど抑制せず、逆に、OLAAPs生成は、糖質無添加の場合よりも増加した。2種或いは3種

15 の糖質を混合した場合には、何れも、無添加に比して、BSAからのタンパクカルボニル生成及びOLAAPs生成が抑制されており、ショ糖と組み合わせた場合でも、これらアルデヒドの付加体の産生が増強されることはなかった。

表7から明らかなように、2, 4-デカジエナール或いはMD

20 Aの添加による、L-リジンからのタンパクカルボニルの生成は、環状四糖の添加により、糖質無添加の場合に比して、2, 4-デカジエナールでは約48%に、MDAでは約66%に抑制された。L-リジンからのOLAAPsの生成は、環状四糖の添加では、糖質無添加の場合に比して、2, 4-デカジエナールでは約67%

25 に、MDAでは39%に抑制された。また、2, 4-デカジエナール或いはMDAの添加によるL-リジンからのタンパクカルボ

ニル及びOLAAPsの生成は、環状四糖に代えて $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース及びマルチトールを添加した場合にも抑制が認められ、その程度は、マルチトールを添加した場合に、2, 4-デカジエナールの添加でのタンパクカルボニルの生成の抑制が、使用した  
5 糖質中で最も高かった以外は、環状四糖とほぼ同程度か、それよりも少し低かった。一方、ショ糖は、前記BSAの場合と同様に、アルデヒド付加体であるタンパクカルボニルやOLAAPsの生成に対して、殆ど抑制効果を示さなかったものの、これらアルデヒド付加体の生成を増強することもない。2種或いは3種  
10 の糖質を混合したものを使用した場合には、何れもリジンからのタンパクカルボニル生成及びOLAAPs生成が抑制されており、糖質の組み合わせにより、これらアルデヒドの付加体の産生が増強されることはなかった。これらの結果より、環状四糖は不飽和化合物である脂質からラジカル反応により生じる脂質過酸化  
15 物によるBSA或いはL-リジンの修飾、変性を効果的に抑制することが判明した。また、他の糖質と併せて使用した場合にも、脂質過酸化物による修飾、変性を増強しないことが判明した。

## 20 実験1-6 ラジカルによる小腸粘膜障害に対する環状四糖の影響

ラジカルによる小腸粘膜障害に対する環状四糖の影響のモデル系として、2, 2-アゾビス(2-アミジノプロパン)2塩酸塩(AAPH)によるラット小腸粘膜酵素液の酸化に対する環状四糖の影響を検討した。

25

### ラット小腸粘膜の酸化に及ぼす環状四糖の影響の測定



ラット小腸粘膜アセトン粉末（シグマ社製）2 g に 50 mM PBS (pH 7.2) 20 ml を添加し、水中でホモジナイズし、10,000 rpm 10 分間遠心分離した上清を、ラット小腸粘膜酵素液（10 mg タンパク質 / ml）として使用した。ラット  
5 小腸粘膜酵素液 0.5 ml、100 mM AAPH 溶液 0.5 ml、実験 1-1 で調製した環状四糖 5 含水結晶の 200 mM 水溶液 0.5 ml を混合し、37℃で2時間、6時間反応後の共役ジエン生成量及び、6時間反応後の TBARS 生成量を測定した。表 8 に、小腸粘膜酵素液ラジカル酸化による共役ジエン生成量の測定結果  
10 を、表 9 に、TBARS 生成量の測定結果を示す。

#### ラット小腸粘膜酵素の酸化に及ぼす環状四糖の影響の測定

前記ラット小腸粘膜酵素液 1 ml、100 mM AAPH 溶液 1 ml、50 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）1 ml、実験 1-1  
15 で調製した環状四糖 5 含水結晶の 400 mM 水溶液 1 ml を混合し、37℃で2時間静置した後、スクラーゼ及びマルターゼの活性を測定した。表 10 にラット小腸粘膜酵素液のラジカル酸化によるスクラーゼ及びマルターゼの活性低下の測定結果を示す。

#### 20 スクラーゼ活性の測定法

50 mM マレイン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.6）に 1% となるようにショ糖を溶解した溶液 0.5 ml に、AAPH-ラット小腸粘膜酵素反応液 0.1 ml を添加し、37℃で30分間反応後遊離するグルコース量を GOD 法により測定した。酵素活性  
25 は、ショ糖より 37℃で1分間に 1  $\mu$ mol のグルコースを遊離する酵素量を 1 単位（U）とした。

マルターゼ活性の測定法

- 5 50 mM マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.6) に 1 % となるようにマルトースを溶解した溶液 0.5 ml に、AAPH - ラット小腸粘膜酵素反応液 0.05 ml を添加し、37℃で30分間反応後遊離するグルコース量を GOD 法により測定した。酵素活性は、マルトースより 37℃で1分間に 2  $\mu$ mol のグルコースを遊離する酵素量を 1 単位 (U) とした。

表 8

	共役ジエン生成量 ( $\mu$ g / mg - タンパク質) (生成率 (%))		
反応時間 (時)	0	2	6
環状四糖無添加	0.00 (-)	16.91 (100)	102.98 (100)
環状四糖添加	0.00 (-)	2.46 (15)	61.84 (60)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{各時間の環状四糖添加時の共役ジエン生成量}}{\text{各時間の環状四糖無添加時の共役ジエン生成量}} \times 100$$

10

表 9

	T B A R S 生成量 ( $\mu$ g / m g - タンパク質) (生成率 (%))
環状四糖無添加	6.10 (100)
環状四糖添加	3.71 (61)

$$\text{生成率 (\%)} = \frac{\text{各時間の環状四糖添加時の T B A R S 生成量}}{\text{各時間の環状四糖無添加時の T B A R S 生成量}} \times 100$$

表 1 0

	スクラーゼ活性 ( $\mu$ / m g - タンパク質) (活性残存率 (%))	マルターゼ活性 ( $\mu$ / m g - タンパク質) (活性残存率 (%))
A A P H 無添加 環状四糖無添加	0.0145 (-)	0.0787 (-)
A A P H 添加 環状四糖無添加	0.0042 (29)	0.0555 (71)
A A P H 添加 環状四糖添加	0.0105 (72)	0.0669 (85)

$$\text{活性残存率 (\%)} = \frac{\text{A A P H 添加時の酵素活性}}{\text{A A P H 無添加時の酵素活性}} \times 100$$

- 5 表 8 或いは表 9 から明らかなように、環状四糖は、A A P H によるラット小腸酵素液の酸化により生成する共役ジエン及び T B A R S を、実験 1 - 4 のリノール酸のラジカル化の場合と同様に効果的に抑制した。また、表 1 0 から明らかなように、環状四糖

は、A A P Hによるラット小腸酵素液の酸化によるスクラーゼ及びマルターゼの活性低下を効果的に抑制し、環状四糖が、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行のみでなく、ラジカル反応により生成した過酸化物により、共存する酵素タンパク質が修飾、変性を受けることを抑制することから、環状四糖は、ラジカル或いはラジカル反応による小腸粘膜障害を抑制することが示唆された。

以上の実験結果から、本発明を応用し、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を、ラジカルの生成及びラジカル反応により分解が進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が生じる恐れのある不飽和化合物を含む物質に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制することができることが判明した。さらに、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、不飽和化合物がラジカル化されて生じる過酸物がタンパク質やアミノ酸を修飾、変性させることを抑制することができる。特に、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、ラジカルによる細胞溶解（自己溶解を含む）や組織の障害を抑制することから、ラジカルの発性により増悪する、火傷、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、潰瘍性大腸炎、胃炎、腸炎などの炎症性疾患の予防剤、治療剤や移植時などの臓器保存剤としても有利に利用できる。このように、本発明の環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を有効成分として含有するラジカル反応抑制剤は、不飽和化合物を含む物質の安定化に大きく寄与できることから、工業的には不飽和化合物を含有する食品分野、化粧品分野、医薬品分野、化学工業品分野などの広範な分野での製品の生産、輸送、保存などにお

いて極めて有利に利用できる。

以下に、本発明のラジカル反応抑制剤及び該ラジカル反応抑制剤を含有せしめた組成物の例具体的に挙げて説明する。しかし、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

5

#### 実施例 1 ラジカル反応抑制剤

特許文献 3 に開示された実施例 2 の方法に準じて、馬鈴薯澱粉から、濃度 80 %、固形物当たり、グルコース 0.6 %、イソマルトース 1.5 %、マルトース 12.3 %、環状四糖 63.5 %、  
10 環状四糖の糖質誘導体 5.2 % 及びその他の糖質 16.9 % を含有する環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するシラップを調製した。本品は、加工飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、保存中に異臭の発生、  
15 退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として好適である。

#### 20 実施例 2 ラジカル反応抑制剤

特許文献 3 に開示された実施例 9 に記載された方法に準じて ( $\alpha$ -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼ処理はせず。)、トウモロコシ澱粉から、濃度 73 %、固形物当たり、グルコース 4.1 %、マルトース、イソマルトースなどの二糖類 8.1 %、マル  
25 トトリオースなどの三糖類 4.0 %、環状四糖 36.5 %、環状四糖の糖質誘導体 17.6 %、その他の糖質 29.7 % を含有す

る環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するシラップを調製した。本品は、加工飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として好適である。

#### 10 実施例 3 ラジカル反応抑制剤

特許文献 3 に開示された実施例 4 の方法に準じて、コーンスターチを原料として、実験 1 - 1 の方法と同様方法により、タピオカ澱粉を原料として調製した環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するシラップを、特許文献 3 の実施例 6 及び実施例 7 記載の方法に準じて精製、濃縮、乾燥・結晶化して、純度 99.6% の環状四糖 5 含水結晶を得た。本品は、加工飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として利用することができる。

前記環状四糖 5 含水結晶をさらに、特許文献 3 に開示された実験 3 1 或いは実験 3 2 の方法に準じて乾燥し、環状四糖 1 含水結晶粉末及び環状四糖無水結晶粉末を調製した。これらの環状四糖

は、環状四糖五含水結晶粉末と同様にラジカル反応抑制剤として  
有利に利用できるだけでなく、ラジカル酸化を受けやすい、揮発  
性香料、有機色素、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンEなどの  
脂溶性ビタミンなどを、ラジカル酸化を抑制しつつ、常温、常圧  
5 で粉末化するための乾燥剤としても極めて有利に利用できる。

#### 実施例 4 ラジカル反応抑制剤

実施例 3 で得た環状四糖 5 含水結晶 60 重量部に対して、市販  
の無水結晶マルチトール((株)林原商事販売、商品名『マビット』)  
10 を 40 重量部を混合し、粉末混合物を得た。本品は、加工飲食品、  
化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めと  
する、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、  
保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や  
機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させる  
15 ことにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、  
安定に保つためのラジカル反応抑制剤として利用することができる。  
る。

#### 実施例 5 ラジカル反応抑制剤

20 実施例 3 で得た環状四糖 5 含水結晶 50 重量部に対して、市販  
の食品級含水結晶  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロース((株)林原商事販売、商  
品名『トレハ』) 50 重量部を混合し、粉末混合物を得た。本品は、  
加工飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工  
業品を始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして  
25 分解が進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性な  
どの品質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成

物に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として利用することができる。また、本品は、直接、或いは、シュガーエステルなどを添加して、造粒、さらには、打錠して、顆粒、錠剤の形態での利用も容易である。

#### 実施例 6 ラジカル反応抑制剤

市販の食品級含水結晶  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロース ((株) 林原商事販売、商品名『トレハ』) を、さらに、水に溶解し、60℃に加熱しながら、減圧濃縮して、トレハロースの濃度が75%の溶液を調製し、室温に放置して結晶を析出させ、該結晶を水で洗浄する操作を2回くり返した後、乾燥、粉碎して調製した、純度99.8%の含水結晶  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロース粉末50重量部と、実施例3で得た環状四糖5含水結晶50重量部とを均質混合して、粉末混合物を得た。本品は、加工飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として利用することができる。本品は、高純度の環状四糖及び  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロースで構成されているので、反応性が極めて低く、安定なので、特に、分子内にアミノ基を含み、還元性の糖とメイラード反応を起こし、その品質に劣化を来すような組成物に対して好適に使用できる。また、本品は、直接、或いは、シュガーエステルなどを添加して、造粒、さらには、打錠して、



顆粒、錠剤の形態での利用も容易である。

#### 実施例 7 ラジカル反応抑制剤

実施例 1 で得た環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を  
5 含有するシラップ 70 重量部に対して、アスコルビン酸 2 重量部、  
ビタミン E 1 重量部、グリセリン脂肪酸エステル 0.5 重量部を  
含有する組成物を調製した。本品は、加工飲食品、化粧品、医薬  
部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を始めとする、ラジカ  
ルの生成及びラジカル反応を起こして分解が進行し、保存中に異  
10 臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品質劣化や機能低下が  
生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含有させることにより、  
ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、安定に保つた  
ためのラジカル反応抑制剤として利用することができる。

#### 15 実施例 8 ラジカル反応抑制剤

実施例 3 で得た環状四糖 5 含水結晶 70 重量部に対して、アス  
コルビン酸 2-グルコシド((株)林原生物化学研究所販売) 2 重  
量部、酵素処理ルチン 2 重量部(東洋精糖株式会社販売、商品名  
『 $\alpha$  G ルチン』)、を混合し、粉末混合物を得た。本品は、加工飲  
20 食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、化学工業品を  
始めとする、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして分解が  
進行し、保存中に異臭の発生、退色、硬化、分解、変性などの品  
質劣化や機能低下が生じ易い不飽和化合物を含有する組成物に含  
有させることにより、ラジカルの生成及びラジカル反応の進行を  
25 抑制し、安定に保つためのラジカル反応抑制剤として利用するこ  
とができる。

### 実施例 9 魚肉練製品

水晒ししたスケトウダラの生肉 4,000 重量部に対し、実施例 1 で調製したラジカル反応抑制剤 200 重量部、クエン酸ナトリウム 5 重量部を加えて、スリ身を製造し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結して冷凍スリ身を製造した。冷凍スリ身を 90 日間  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存後に解凍し、グルタミン酸ナトリウム 80 重量部、馬鈴薯澱粉 200 重量部、氷水 300 重量部、トリポリリン酸ナトリウム 8 重量部、食塩 120 重量部及びマルチツール 10 重量部とを溶解しておいた水溶液 100 重量部を加えて攪潰し、約 120 g ずつを定形して板付した。これらを、30 分間で内部の品温が約  $80^{\circ}\text{C}$  になるように蒸し上げた。次いで、室温で放冷したのち、 $4^{\circ}\text{C}$  で 24 時間放置して魚肉練製品を得た。スケトウダラの冷凍スリ身は、環状四糖、及び／又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物がタンパク質に対して優れた冷凍耐性を付与するため、冷凍保存後も、鮮度が十分に保持されており、それを原料とした本品は、風味良好、肌面が細やかで、艶やかな光沢を有していた。しかも、本品に含まれる脂質をはじめとする不飽和化合物の安定性が、環状四糖、及び／又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物により高められているばかりでなく、ラジカル化した不飽和化合物の過酸化物によるタンパク質やアミノ酸の修飾、変性も抑制されるので、保存安定性にも優れているという特徴がある。

### 25 実施例 10 生鮮魚介類の鮮度保持剤

実施例 5 で調製した環状四糖と  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースを等量混

合した粉末混合物 100 重量部と、クエン酸（結晶）10 重量部、  
酵素処理ルチン 1 重量部、ポリフェノール 2 重量部とを均一に混  
合し、粉末状の生鮮魚介類の鮮度保持剤を得た。本品は、環状四  
糖が、魚の油脂成分のラジカル反応を抑制することに加えて、環  
5 状四糖、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、ポリフェノール、有機酸、酵素  
処理ルチンが相乗的に作用して、魚肉の冷凍変性を抑制すること  
から、生鮮魚介類及びその冷凍品の鮮度保持剤として好適である。

本品 400 重量部を 12 L の海水に溶解し、さらに、細かく砕  
いた市販の氷 4 kg を入れて冷却した。この水溶液に、漁港で水  
10 揚げした直後のアジ 5 kg を、浸漬処理し、10 時間後に取り出  
して、体表及び鰓の状態を観察したところ、水揚げ直後と変わら  
ない外観を呈していた。さらに、これを密封容器に入れて、 $-2$   
 $0^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で 10 日間保存後、解凍してその状態を観察したと  
ころ、アジの体表は全く変化が起きておらず新鮮な状態を保って  
15 いた。

#### 実施例 11 米飯

水洗いして水切りした米 300 重量部に水を米の 1.25 倍量  
と実施例 4 で調製したラジカル反応抑制剤 13.5 重量部を混合  
20 して浸漬後、家庭用炊飯器にて炊飯して米飯を得た。本品は、米  
飯中の脂質をはじめとする不飽和化合物の安定性が環状四糖によ  
り高められているばかりでなく、ラジカル化した不飽和化合物の  
過酸化物によるタンパク質やアミノ酸の修飾、変性も抑制される  
ので、不快な米糠臭の発生が抑制され、比較的長期間炊飯直後の  
25 好ましい風味が保持されるという特徴がある。また、環状四糖は、  
澱粉の老化防止効果、タンパク質の冷蔵・冷凍変性防止効果を併

せ持っているので、本品は、老化や冷凍変性の発生するチルド冷蔵用や冷凍保存用の米飯として有利に利用できる。

#### 実施例 1 2 粉末油脂

5 大豆サラダ油 100 重量部及びレシチン 1 重量部に水 10 重量部を室温で混合した後、これに実施例 5 のラジカル反応抑制剤 100 重量部を混合して粉末化し、篩にかけて粉末油脂を得た。本品における不飽和化合物は、環状四糖によりラジカルの生成及びラジカル反応の進行が抑制され、又、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースが不飽和化合物と会合物を形成することによって、その安定性が高め  
10 られているうえ、種々の食品素材とともに配合された際に、その配合される食品素材における不飽和化合物の安定化をも達成することができ、また、食品素材がタンパク質やアミノ酸を含有するものにあっては、ラジカル化した不飽和化合物の過酸化物による  
15 タンパク質やアミノ酸の修飾、変性も抑制されるので、マヨネーズ、ドレッシングなどの調味材料、高カロリー経管栄養剤、配合飼料などに有利に利用できる。

#### 実施例 1 3 サラダドレッシング

20 水 40.8 質量部、蒸留ホワイトビネガー 20 質量部、植物油 15 質量部、砂糖 5 質量部、食塩 2 質量部、ガーリックパウダー 1.0 質量部、タマネギパウダー 0.7 質量部、グラントホワイトペッパー 0.1 質量部、キサンタンガム 0.3 質量部、ソルビン酸カリウム 0.1 質量部、実施例 3 で調製した粉末状のラジカル  
25 ル反応抑制剤 15 質量部を混合してサラダドレッシングを調製した。本品は、環状四糖によりラジカル反応が抑制されるので、油

性成分の劣化や、ガーリックパウダー、タマネギパウダー、グラ  
ランドホワイトペッパーなどの風味味の劣化が抑制されるので、  
長期間、その品質が安定に保持される。また、本品は、環状四糖  
が、脂肪の代替品として、脂肪のもつクリーム様の、豊かな口当  
5 たりを付与するので、植物油を通常のドレッシングの半量しか使  
用してしていないにも関わらず、ドレッシングの好ましさを失わ  
ず、脂肪含有時よりも著しく低カロリーのだレッシングである。  
しかも、本品は、その水相に環状四糖を含有しているので、砂糖  
のみを含有するドレッシングに比して、油相との分離が早く、し  
10 かも、その分離度が高い、高品質のサラダドレッシングである。

#### 実施例 14 クリーム

シア分別脂（融点 38℃）80部と菜種ヤシ油（融点 35℃）  
20部との混合油脂 35質量部、大豆レシチン（HLB 3）0.  
15 3質量部、モノグリセリン脂肪酸エステル（HLB 3）0.03  
質量部、ヘキサグリセリンペンタエステル（HLB 4）0.15  
質量部、水 60質量部、脱脂粉乳 4質量部、リン酸のアルカリ金  
属塩 0.1質量部を使用し、常法により、予備乳化を行い、70  
Kg/cm<sup>2</sup> の加圧条件で均質化後、145℃、数秒程度の超高  
20 温加熱滅菌処理し、70Kg/cm<sup>2</sup> の加圧条件にて再均質化し  
た後、冷却し、約 24 時間エージングを行い起泡性乳化物を調製  
した。この起泡性乳化物 100質量部に対して、実施例 3 で調製  
した粉末状のラジカル反応抑制剤 8質量部を加えて、ケンウッド  
ミキサーを使用して、2分45秒間ホイップして、オーバーラン  
25 75% のクリームを調製した。本品は、環状四糖がラジカル反応  
を抑制するので、風味の劣化が抑制されており、5～20℃で7

日間保存後のもの、或いは、 $-20^{\circ}\text{C}$ に14日間凍結保存後解凍したしたものは、いずれも、保形性、風味、口溶けがよく、また、冷凍保存時にも、ひび割れも認められなかった。

#### 5 実施例 1 5 可食性フィルム

プルラン（商品名『P I - 2 0』、株式会社林原商事販売）30重量部、水70重量部、及び実施例2で調製したラジカル反応抑制剤1.5重量部を加えて完全に溶解した。この溶解液100重量部に対して、カラギーナン1重量部及びレシチン0.1重量部  
10 を加えて溶解混合し、均一な溶液とした。これを、常法にしたがって、ポリエステルフィルム上に流延し、引取速度3m/分で、厚さ0.03mmのフィルムとし、 $90^{\circ}\text{C}$ の熱風で乾燥させて製品とした。本品は、プルランのみを使用したフィルムとは違って、水系で速溶せず、徐々に溶解、崩壊する可食性フィルムであり、  
15 しかも、本品に含まれる不飽和化合物の安定性が環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物により高められているので、保存安定性にも優れているという特長がある。従って、本品はオブラートなどと同様に、食品分野や医薬品分野などで有利に利用できる。

#### 20 実施例 1 6 焙煎アーモンド

精選したアーモンド100重量部を常法により焙煎し、この高温のアーモンドを攪拌しつつ、実施例5で調製したラジカル抑制剤を予め水に溶解して20%水溶液としたもの3重量部をできるだけ均一に噴霧混合し、次いで、食塩粉末をまぶして焙煎アーモンドを得た。本品は風味の優れた焙煎アーモンドであり、脂質の  
25 ラジカル反応が抑制されることから、その保存安定性に優れてお

り、そのまま或いは、製菓・製パン用の材料として好適である。

#### 実施例 17 茶飲料

緑茶の茶葉 25 g に 70℃ の脱イオン水 800 g を添加して 6  
5 分間、茶の成分を抽出した後、濾過により茶葉の残渣を除去して、  
700 ml の抽出液を得た。得られた抽出液を脱イオン水で 5 倍  
に希釈して、L-アスコルビン酸を 450 ppm となるように添  
加し、炭酸水素ナトリウムにより、pH を 6.2 に調整した。次  
いで、実施例 3 で調製した環状四糖 5 含水結晶粉末を重量換算で  
10 0.2% となるように添加後、耐熱性ガラス容器に 350 ml づ  
つ分注・密閉し、121℃、10 分間の殺菌を行って茶飲料とし  
た。本品は、環状四糖が、殆ど甘味がないことから、茶本来の風  
味が妨げられることはなく、本品は、20℃ で 6 ヶ月保存後も、  
褐変が抑制され、茶の緑色がよく保持されているとともに香りも  
15 良好な茶飲料である。なお、本品は、酵素処理ルチンを併用する  
ことにより、更に、その保存安定性が向上する。

#### 実施例 18 脂肪含有乳剤

精製大豆油 100 g に精製大豆レシチン 12 g 及びグリセリン  
20 25 g を加え、湯浴で加温し、ポリトロンホモジナイザーで乳化  
を行った後、μフルイダイザーを使用して、さらに乳化した。得  
られた乳化液に予め、実施例 5 で調製したラジカル反応抑制剤 8  
0 g を溶解した水溶液 250 ml を加え、さらに蒸留水を加えて、  
全液量を 1,000 ml に調整した。次いで、炭酸水素ナトリウ  
25 ムを加えて、pH を 7.2 に調整し、メンブランフィルターで濾  
過後、濾液を 250 ml のバイアルに充填し、120℃ で 20 分

間高圧蒸気滅菌を行い環状四糖含有脂肪乳剤を得た。本品は、環状四糖によりラジカル反応が抑制されるので、ブドウ糖などの糖の使用時に問題となるギ酸をはじめとする有機酸の発生や、生体に有害な遊離脂肪酸の生成が抑制されており、長期に安定な、脂肪乳剤であり、そのまま、或いは、アミノ酸やビタミン類などを添加して、経口或いは非経口的な栄養補給に有利に利用できる。

#### 実施例 19 香料

水 100 g に HLB 15 のショ糖脂肪酸エステル 5 g、実施例 4 で調製したラジカル反応抑制剤 75 g を加えて溶解し、85 ~ 90 °C で 15 分間加熱殺菌した。この溶液を約 40 °C に冷却後ホモミキサーで攪拌しながら、レモンオイル 10 g を混合して乳化液を得た。本品は、さらに、噴霧乾燥などの方法で乾燥することにより、容易に粉末香料とすることができる。本品及び本品を粉末化したレモンオイル香料は、いずれも長期保存による劣化臭の発生がなく良好な香気香味を保持していた。

#### 実施例 20 ビタミン E 製剤

ビタミン E (α-トコフェロール、和光純薬株式会社製) をエタノール (試薬特級、片山化学株式会社販売) に溶解し、ビタミン E を 10 % 濃度含むエタノール溶液を調製した。実施例 3 で調製した環状四糖無水結晶粉末 10 g をガラス製の乳鉢に採り、それにエタノール又は酢酸を少量添加しガラス棒でよく混合し、液状物質の添加と混合を粉末状態が維持できなくなる直前まで繰り返し、ビタミン E 製剤を調製した。対照として、分枝サイクロデキストリン粉末 (商品名『イソエリート P』、塩水港精糖株式会社



製造)、特開平 7-213283 号に記載の方法に準じて調製した  
 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース無水結晶粉末、デキストリン粉末(商品名  
『パインファイバー』、松谷化学株式会社製造)、及び可溶性澱粉  
(試薬特級、片山化学株式会社販売)を用いて、同様の方法でビ  
5 タミン E 製剤を調製した。尚、本実施例に使用した環状四糖及び  
対照として使用した各糖質は、何れも、予め 80℃で 16 時間真  
空乾燥して使用し、ビタミン E・エタノール含有環状四糖粉末、  
及び、ビタミン E・エタノール含有分岐サイクロデキストリン粉  
末、ビタミン E・エタノール含有  $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース粉末、ビ  
10 タミン E・エタノール含有デキストリン粉末、ビタミン E・エタ  
ノール含有可溶性澱粉粉末を調製した。次いで、それぞれの粉末  
を五酸化リンの入ったデシケーター中で、室温で、5 時間、減圧  
乾燥してエタノールを揮散させ、それぞれビタミン E 含有粉末を  
調製した。得られた 5 種類の糖質とビタミン E からなる粉末を、  
15 それぞれ約 0.5 g を精秤して 20 ml 容のガラス製バイアル瓶  
5 本に採り、密栓し、常圧、60℃で保存し、試験標品の、調製  
直後、保存 1 日間、保存 3 日間、保存 7 日間、保存 14 日間の、  
それぞれの時点でのビタミン E 量を調べた。各試験標品中のビタ  
ミン E の定量は、試験標品の入ったバイアルビンにエタノールを  
20 10 ml 加えよく懸濁してビタミン E を抽出し、遠心分離(10,  
000 rpm、10 分間)して得た上清を用いて、ガスクロマト  
グラフィー法(GC)で各試験標品のビタミン E を定量した。尚、  
GC はカラム DB-1 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、J & W  
サイエンス社製)を装着した GL 装置 GC-14A (島津株式会  
社製)を用いて行った。各ビタミン E 含有糖質粉末それぞれ 1 g  
25 当たりのビタミン E 量及び調製直後の試験標品のビタミン E 量を

100%とした相対値を、抑制率として表11に示す。

表 1 1

糖質	ビタミンE量 (mg) (残存率)				
	調製直後	保存1日間	保存3日間	保存7日間	保存14日間
環状四糖	75.9 (100%)	74.4 (98%)	72.0 (95%)	68.5 (90%)	46.3 (61%)
分岐サイクロデキストリン	34.6 (100%)	32.5 (94%)	27.0 (78%)	18.5 (53%)	12.4 (36%)
$\alpha$ , $\alpha$ -トレハロース	36.7 (100%)	36.2 (99%)	31.0 (85%)	26.6 (73%)	15.1 (41%)
デキストリン	29.8 (100%)	24.9 (84%)	22.6 (76%)	18.1 (61%)	5.0 (17%)
可溶性澱粉	19.3 (100%)	16.6 (86%)	14.9 (77%)	11.1 (57%)	5.8 (30%)

残存率は、調製直後の試験試料中のビタミンE量を100%とした場合の相対値

表11の結果から明らかなように、糖質として環状四糖を使用したビタミンE製剤粉末は、ビタミンE含有分岐サイクロデキストリン粉末やビタミンE含有 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース粉末、ビタミンE含有デキストリン粉末、ビタミンE含有可溶性澱粉粉末と比べ、残存するビタミンE量は高いことがわかる。このように本発明のラジカル反応抑制剤（環状四糖）を含有する、ビタミンE製剤は、常圧、60℃の過酷な条件ですら、ラジカル反応を抑制しビタミンEの酸化分解を抑制することから、その粉末化、製剤化の工程管理が容易であり、しかも、該製剤は、脱酸素剤の併用や酸素不透過性のカプセルに封入するなどの通常のビタミンE製剤の保存条件下にあっては、環状四糖以外の糖質を使用したビタミンE製剤に比して、長期間安定なビタミンE製剤として有利に利用できる。

#### 実施例 2 1 ビタミンD錠剤

ビタミンDとしてビタミンD<sub>3</sub>（コレカルシフェロール、和光

純薬株式会社製) をエタノール (試薬特級、片山化学株式会社販売) に溶解し、ビタミン D を 3 % 濃度含むエタノール溶液を 1 . 5 m l を、実施例 3 で調製した環状四糖無水粉末を 8 g に添加し、実施例 20 と同様の方法により粉末化し、減圧乾燥して、環状四糖を含有するビタミン D 3 製剤粉末を調製した。対照として、実施例 20 で使用した分枝サイクロデキストリン粉末 (商品名『イソエリート P』)、実施例 20 で使用した  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロース無水結晶粉末、無水結晶マルトース (株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』)、及び、セルロース (商品名『フナセル S F』、フナコシ株式会社製造) を糖質として使用し、環状四糖を含有するビタミン D 3 製剤粉末を調製したと同様の方法により、それぞれの糖質を含有するビタミン D 3 粉末を調製した。得られた各々の糖質を含有するビタミン D 3 粉末を、それぞれ約 0 . 3 g を採り、打錠機で 2 0 0 K g / c m <sup>2</sup>、2 分間加圧して、各々の糖質を含有するビタミン D 3 錠剤を調製した。得られた錠剤を精秤した後、各々の糖質を含有するビタミン D 3 錠剤について、1 個ずつ 5 本の 2 0 m l 容のガラス製バイアル瓶に入れ、密栓し、常圧、6 0 °C で保存し、試験標品の、調製直後、保存 2 時間、保存 1 日間、保存 2 日間、保存 7 日間の、それぞれの時点のビタミン D 3 量を調べるための試験標品とした。錠剤中のビタミン D の定量は、試験標品の入ったバイアル瓶に、7 0 % エタノール水溶液を 1 0 m l 加えガラス棒で錠剤を粉碎してビタミン D 3 を抽出した後、全量を 5 0 m l とし、さらに、遠心分離 (1 0 , 0 0 0 r p m、1 0 分間) して得た上清を精密濾過し、得られた濾過液の吸光度を 2 6 5 n m の波長で測定した。ビタミン D 3 量は、波長 2 6 5 n m における吸光度係数  $E_{1\%}$  を 4 7 5 として計算した。

各々の糖質を含有するビタミンD<sub>3</sub>錠剤それぞれ1g当たりのビタミンD<sub>3</sub>量及び調製直後の試験標品のビタミンD量を100%とした相対値を、抑制率として表12に示す。

表 1 2

糖質	ビタミンD <sub>3</sub> 量 (mg) (残存率)				
	調製直後	保存2時間	保存1日間	保存2日間	保存7日間
環状四糖	5.27 (100%)	4.57 (87%)	3.49 (66%)	2.91 (55%)	2.65 (50%)
分岐サイクロデキストリン	5.36 (100%)	0.87 (16%)	0.82 (15%)	0.82 (15%)	0.87 (16%)
α, α-トレハロース	4.67 (100%)	1.58 (34%)	1.11 (24%)	1.02 (22%)	1.05 (22%)
デキストリン	4.93 (100%)	1.26 (26%)	0.93 (19%)	0.95 (19%)	0.90 (18%)
セルロース	4.51 (100%)	1.46 (32%)	1.05 (23%)	1.00 (22%)	0.95 (21%)

残存率は、調製直後の試験試料中のビタミンD量を100%とした場合の相対値

5

表12の結果から明らかなように、分岐サイクロデキストリン含有ビタミンD<sub>3</sub>錠剤、α, α-トレハロース含有ビタミンD<sub>3</sub>錠剤、デキストリン含有ビタミンD<sub>3</sub>錠剤、可溶性澱粉含有ビタミンD<sub>3</sub>錠剤が、保存開始7日目には53~75%のビタミンD<sub>3</sub>残存量であるのに対し、環状四糖含有ビタミンD<sub>3</sub>錠剤は、90%のビタミンD<sub>3</sub>が残存し、14日間の保存後にも、他の糖質を含有する錠剤が、何れも約40%或いはそれ以下のビタミンD<sub>3</sub>残存量でしかないのに対して、環状四糖を含有する錠剤では、その61%が残存していることが確認された。このように本発明のラジカル反応抑制剤（環状四糖）を含有するビタミンD<sub>3</sub>錠剤は、他の糖質を含有する錠剤に比して、常圧、60℃の過酷な条件ですら、ラジカル反応を抑制し、ビタミンD<sub>3</sub>の酸化分解を抑制することから、その粉末化、錠剤化の工程管理が容易であり、しかも、該錠剤は、脱酸素剤の併用や酸素不透過性の皮膜でコーティ

10

15

ングするなどの通常のビタミンD<sub>3</sub>錠剤の保存条件下にあっては、環状四糖以外の糖質を含有するビタミンD<sub>3</sub>錠剤に比して、長期間安定なビタミンD<sub>3</sub>錠剤として有利に利用できる。

## 5 実施例 2 2 皮膚外用化粧クリーム

精製水 48 重量部にプロピレングリコール 5 重量部と実施例 8 で調製したラジカル反応抑制剤 10 重量部とを加え、70℃にまで加温して水相部を調製した。一方、スクワラン 40 重量部、還元ラノリン 15 重量部、ミツロウ 10 重量部、オレイルアルコール 8 重量部、脂肪酸グリセリン 5 重量部、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20 E. O.) 3 重量部、親油型モノステアリン酸グリセリン 3 重量部、グリチルリチン酸ジカリウム 1 重量部、藍の水抽出液 2 重量部と香料ならびに抗酸化剤の適量を 70℃の条件下で均一な状態にまで混合し、油相部を調製した。

15 この油相部を上記の水相部に加えて、常法にしたがい予備乳化した後、ホモミキサーで均一に乳化し、冷却して、水中油型の皮膚外用クリームを得た。本品は皮膚に対して優れた保湿性を発揮するうえ、その保湿性の主体である油性成分における不飽和化合物の安定性が環状四糖並びに $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースにより高められているので、保存安定性に優れた高品質の皮膚外用剤として有利

20 に利用できる。また、該クリームは、環状四糖により脂質のラジカル反応が抑制されるだけでなく、グリチルリチン酸及び／又は藍の成分に由来するヒアルロニダーゼ活性阻害作用をはじめとする種々の作用により、皮膚の炎症が抑制され、その結果、シミ、

25 しわやこじわの発生などに代表される皮膚の老化が抑制され、はりのあるみずみずしい肌を維持する効果を奏することができる。

### 実施例 2 3 点眼剤

実施例 6 で調製したラジカル反応抑制剤 4 . 5 重量部、塩化ナトリウム 0 . 4 重量部、塩化カリウム 0 . 1 5 重量部、リン酸 2  
5 水素ナトリウム 0 . 2 重量部、硼砂 0 . 1 5 重量部、アスコルビン酸 2 - グルコシド（株式会社林原生物化学研究所販売） 0 . 1 重量部を滅菌精製水に溶解し、全量を 1 0 0 m l として、公知の方法により無菌製剤を調製して点眼剤を調製した。p H は 7 . 3 に調整した。本品は、ラジカル反応抑制剤に含有される環状四糖が  
10 眼の炎症を抑制するとともに、 $\alpha$  ,  $\alpha$  - トレハロースが眼の粘膜を乾燥から保護する効果を発揮し、しかも、アスコルビン酸 2 - グルコシドが、酵素的により徐々に分解されてビタミン C の持続的な給源となることから、本点眼剤は、眼の疲労の回復や、アレルギー性の眼の炎症やドライアイなどの眼性疾患の予防、治療、  
15 或いは、洗眼剤として有利に利用できる。

### 実施例 2 4 外傷治療用軟膏

実施例 3 の方法により調製した環状四糖 5 含水結晶粉末 5 0 0 重量部に感光素 1 0 1 号を 0 . 0 2 重量部添加混合後、更に 1 0 %  
20 プルラン水溶液 2 0 0 重量部を加えて混合し、適度の伸び、付着性を有する外傷治療用軟膏を得た。本品は創傷面に直接塗るか、ガーゼなどに塗るなどして患部に使用することにより、切傷、擦り傷、火傷、水虫などの外傷を治療することができる。また、本品は、環状四糖が、感光素 1 0 1 号のラジカル反応を抑制して製  
25 剤を安定化するとともに、ラジカル反応に起因する患部の炎症を抑制するので、その治療期間が短縮され、創面もきれいに回復する

ことができる。しかも、環状四糖は、サイクロデキストリンで報告されているような溶血作用がなく、逆に、溶血を抑制する作用があることから、本発明の外傷治療用軟膏は出血性の外傷に対しても有利に使用できるという特徴を有している。

5

#### 実施例 2 5 インターフェロナー $\alpha$ 含有座剤

インターフェロナー $\alpha$ 製剤（大塚製薬株式会社販売、商品名「オーアイエフ $\alpha$ 」注射用 $1,000$ 万単位）を $0.1\text{ ml}$ の蒸留水に溶解し、その $0.1$ 重量部を、実施例 6 の方法により調製した環状四糖の粉末をガラス容器に入れ、予め $140^\circ\text{C}$ に加熱したオイルバス中にそのガラス容器を $30$ 分間保持して調製した環状四糖の $1$ 含水結晶 $0.9$ 重量部とを均質に混合したものと、予め $40^\circ\text{C}$ に加温溶解した油脂性基剤のファーマゾル $9$ 重量部とを混合し、これを型に流し、冷却してインターフェロナー $\alpha$ 含有座剤を得た。本品 $1\text{ g}$ は、インターフェロン活性 $100$ 万単位を含有している。本品は、インターフェロナー $\alpha$ が安定化された座剤であり、ヘルペスウイルス感染症、肝炎、悪性腫瘍をはじめとするインターフェロナー $\alpha$ 感受性疾患の治療に有利に利用できる。

#### 20 実施例 2 6 酵素剤

微生物由来の乳酸脱水素酵素（東洋紡株式会社製、フナコシ株式会社販売、 $429$ 単位/ $\text{mg}$ ） $4\text{ mg}$ を $10\text{ ml}$ の脱イオン水に溶解した酵素剤の水溶液 $0.3\text{ ml}$ と、脱イオン水に実施例 4 で調製した環状四糖を $3.5\%$ となるように溶解した水溶液 $0.3\text{ ml}$ を凍結乾燥用ガラス容器（液溜まり部の直径 $10\text{ mm}$ 、高さ $50\text{ mm}$ ）内で穏やかに攪拌、混合後、常法により凍結乾燥し

て、乳酸脱水素酵素の粉末標品を調製した。本品は、環状四糖により、凍結乾燥時の冷凍、乾燥変性が抑制されるために、製造時の活性に酵素活性が減少することもなく、また、室温、冷蔵、或いは冷凍保存でも活性は長期間安定に保持される。さらに、本品  
5 の水溶液を約4乃至約 $-1^{\circ}\text{C}$ で冷蔵保存、或いは、それを凍結して保存した場合にも、その酵素活性は長期間安定に保持することが可能である。

#### 実施例 27 凍結乾燥補体制剤

10 モルモットから血液を採取後、血清画分を分離し、その1重量部に対して、予め実施例5のラジカル反応抑制剤1重量部を生理食塩水（株式会社大塚製薬工場製造、商品名『大塚生食注』）9重量部に溶解しておいた溶液1重量部を加え、均質になるように攪拌溶解し、0.2mlずつ2ml容の管瓶に分注し、常法に従って、最終到達温度 $25^{\circ}\text{C}$ の乾燥条件で、凍結乾燥した。本品は、  
15 本品に含まれる脂質をはじめとする不飽和化合物の安定性が環状四糖により高められているため、血清中の不飽和化合物のラジカル化により生成する過酸化物による補体の修飾、変性が抑制されるので、補体の持つ一連の酵素反応系やその他の生理活性は、冷蔵  
20 或いは室温で長期保存した場合にも安定に保持されるという特徴がある。しかも、環状四糖は、凍結及び／又は乾燥による変性からタンパク質を保護するために、凍結乾燥時の補体の活性の低下も抑制されるので、本品は、高品質の臨床診断或いは免疫学の試験用の試薬として有利に利用できる。

#### 実施例 28 塩化ビニル樹脂



塩化ビニル樹脂 100 重量部、テトラヒドロフラン 500 重量部、ステアリン酸バリウム 0.001 重量部、ステアリン酸亜鉛 0.001 重量部に実施例 3 で調製した環状四糖無水結晶粉末 0.6 重量部を添加して、均質になるように混合し、更に、180℃  
5 に加温して、5 分間混練し、厚さ 0.5 mm のシートを作成した。本品は、添加した環状四糖により紫外線などに起因するラジカル反応が抑制されるため、耐光性に優れた塩化ビニル樹脂である。また、本品は環状四糖を添加することにより、その耐熱性も向上することから、環状四糖は、樹脂の安定化剤として好適であること  
10 とが判明した。

#### 産業上の利用の可能性

本発明は、ラジカルの生成及びラジカル反応を起こして不飽和化合物の分解が進行すること、さらには、不飽和化合物の過酸化  
15 物によるタンパク質などの修飾、変性をも抑制するために、グルコースを構成糖とする非還元性糖質である環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物が、ラジカルの生成及びラジカル反応の抑制作用が強いことを見出し、ラジカルの生成及びラジカル反応が発生する前、または、発生している有機の  
20 不飽和化合物を含む反応系に上記の環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を有効成分とするラジカル反応抑制剤を含有させることで、不飽和化合物のラジカルの生成及びラジカル反応の進行を抑制し、さらには、不飽和化合物の過酸化物によるタンパク質などの修飾、変性をも抑制するものである。  
25 しかも、環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物は、食品として安全で、且つ、非常に安定である

ことから、本発明による環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物を含有するラジカル反応抑制剤の利用分野は、食品分野、農林水産分野、化粧品分野、医薬部外品、医薬品分野を含めて、日用品分野、化学工業分野、染料分野、塗料  
5 分野、建材分野、香料分野、化学薬品分野、合成繊維分野、色素分野、感光色素分野、光記録媒体分野など多岐に渡る。本発明は、この様に顕著な作用効果を有する発明であり、産業上の貢献は誠に大きく、意義のある発明である。

10

15

20

25

## 請求の範囲

1. サイクロ{ $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ )  
-  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラ  
5 ノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ )で示さ  
れる環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との  
混合物を有効成分とするラジカル反応抑制剤。
2. サイクロ{ $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ )  
-  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラ  
10 ノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ )で示さ  
れる環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との  
混合物とともに、トレハロース及び／又はマルチトールを含有す  
ることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のラジカル反応抑制  
剤。
- 15 3. サイクロ{ $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ )  
-  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラ  
ノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ )で示さ  
れる環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との  
混合物とともに、ラジカルスカベンジャーを含有することを特徴  
20 とする請求の範囲第1項又は第2項に記載のラジカル反応抑制剤。
4. ラジカルスカベンジャーが、ビタミン類、フラボノイド類、  
ポリフェノール類、テルペン類、不飽和脂肪酸及び酸化防止剤か  
ら選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求の範囲  
第3項に記載のラジカル反応抑制剤。
- 25 5. サイクロ{ $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ )  
-  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラ

ノシルー（1→3）-α-D-グルコピラノシルー（1→}で示される環状四糖、又は、この環状四糖と環状四糖の糖質誘導体との混合物とともに、還元性糖質、非還元性糖質、サイクロデキストリン類、水溶性多糖類、香辛料、酸味料、旨味料、酒類、無機塩、  
5 乳化剤、香料及び色素から選ばれる1種又は2種以上を含有することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかに記載のラジカル反応抑制剤。

6. サイクロ{→6}-α-D-グルコピラノシルー（1→3）-α-D-グルコピラノシルー（1→6）-α-D-グルコピラ  
10 ノシルー（1→3）-α-D-グルコピラノシルー（1→}で示される環状四糖を、無水物換算で、1w/w%以上含有することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載のラジカル反応抑制剤。

7. 請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載のラジカル  
15 反応抑制剤とともに不飽和化合物を含む、ラジカル反応の抑制された組成物。

8. 不飽和化合物が、脂肪酸類、単純脂質類、複合脂質類、テルペン類、アルコール類、配糖体、ビタミン類、タンパク質、ペプチド、アミノ酸類、酵素類、ホルモン類、サイトカイン類、抗  
20 体類、香料、色素、乳化剤、合成高分子類及びビニル類から選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求の範囲第7項に記載のラジカル反応の抑制された組成物。

9. ビタミン類がビタミンD、ビタミンE及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上であることを特徴とする請求の範囲  
25 第8項に記載のラジカル反応の抑制された組成物。

10. 飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、雑

貨、化学工業品、又は高分子形成物である請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載のラジカル反応の抑制された組成物。

1 1 . 請求の範囲第 1 項乃至第 6 項のいずれかに記載のラジカル反応抑制剤を、不飽和化合物を含む組成物に含有させることを  
5 特徴とするラジカル反応の抑制方法。

1 2 . 請求の範囲第 1 項乃至第 6 項のいずれかに記載のラジカル反応抑制剤を、不飽和化合物を含む組成物に含有させ、ラジカル反応により生じる不飽和化合物の過酸化物が、不飽和化合物以外の成分を変性させることを抑制することを特徴とするラジカル  
10 反応の抑制方法。

1 3 . 不飽和化合物が、脂肪酸類、単純脂質類、複合脂質類、テルペン類、アルコール類、配糖体類、ビタミン類、タンパク質類、ペプチド類、アミノ酸類、酵素類、ホルモン類、サイトカイン類、抗体類、香料、色素、乳化剤、合成高分子類及びビニル類  
15 から選ばれる 1 種又は 2 種以上であることを特徴とする請求の範囲第 1 1 項又は第 1 2 項のいずれかに記載のラジカル反応の抑制方法。

1 4 . ビタミン類がビタミン D、ビタミン E 及びそれらの誘導体から選ばれる 1 種又は 2 種以上であることを特徴とする請求の  
20 範囲第 1 3 項に記載のラジカル反応の抑制方法。

1 5 . 不飽和化合物を含む組成物が飲食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、雑貨、化学工業品、又は高分子形成物であることを特徴とする請求の範囲第 1 1 項乃至第 1 4 項のいずれかに記載のラジカル反応の抑制方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10794

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C09K15/06, A61K47/26, A61J47/36, A61K7/00, C08F2/40,  
A23L1/03, A23L3/3562, C11B5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C09K15/06-15/08, A61K47/26, A61K47/36, A61K7/00-7/50,  
C08F2/40, A23L1/03, A23L3/3562, C11B5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 1321148 A1 (Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.), 25 June, 2003 (25.06.03), & JP 2003-160495 A2 & US 2003/108593 A1	1-15
A	WO 02/010361 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 07 February, 2002 (07.02.02), & EP 1229112 A1 & US 2003-194762 A1	1-15
A	US 4775749 A (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 04 October, 1988 (04.10.88), & JP 61-34156 A & FR 2550445 A & US 4777162 A & US 4831022 A	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 21 November, 2003 (21.11.03)	Date of mailing of the international search report 09 December, 2003 (09.12.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C09K15/06、A61K47/26、A61K47/36、A61K7/00、C08F2/40、A23L1/03、A23L3/3562、C11B5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C09K15/06-15/08、A61K47/26、A61K47/36、A61K7/00-7/50、C08F2/40、A23L1/03、A23L3/3562、C11B5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	EP 1321148 A1 (Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.) 2003.06.25 & JP 2003-160495 A2 & US 2003/108593 A1	1-15
A	WO 02/010361 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo) 2002.02.07 & EP 1229112 A1 & US 2003-194762 A1	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 陽子

印

4V 9279

電話番号 03-3581-1101 内線 3483

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 4775749 A (Kabushiki Kaisha Ha yashibara Seibutsu Kagaku Kenky ujo) 1988. 10. 04&JP 61-34156 A&FR 2550445 A&US 4777162 A&US 483102 2 A	1-15